

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
13. März 2003 (13.03.2003)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**PCT WO 03/020941 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12P 7/00, 9/00, 13/00, C07F 9/09 (74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach 860 820, 81635 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09611 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 28. August 2002 (28.08.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 42 014.5 28. August 2001 (28.08.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEGUSSA BIOACTIVES GMBH [DE/DE]; Lise-Meitner-Strasse 34, 85354 Freising (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOPPE, Hans-Ulrich [DE/DE]; Lise-Meitner-Strasse 34, 85354 Freising (DE). BÖKENKAMP, Dirk [DE/DE]; Lise-Meitner-Strasse 34, 85354 Freising (DE). HUANG, Sinian [—/DE]; Lise-Meitner-Strasse 34, 85354 Freising (DE).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF PHOSPHOLIPIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PHOSPHOLIPIDEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of phospholipids of general formula (I) with the exclusive aid of phospholipase D from a phospholipid mixture and without using organic solvents, wherein phosphatidyl acid is produced in an aqueous, unbuffered phase with phospholipase D and at least one bivalent metal ion in a first step and at least one phospholipid of general formula (I) is produced from the phosphatidyl acid having at least one compound of general formula (II)  $R^3 - OH$  in a second step. Phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylinositol and/or phosphatidylglycerine are obtained as products. In another embodiment of the invention, the P.I.D is identical or different in both steps of said method, wherein in the latter case the pI values for the first and second steps of the method are different, said values lying particularly between 6.5 and 8.0, especially between 5.0 and 7.5. The novel method makes it possible to easily obtain products with high yields and excellent purity thereby rendering said products suitable for applications in the food industry and pharmaceutical applications.

(57) Zusammenfassung: Mit dem vorliegenden Verfahren werden Phospholipide der allgemeinen Formel (I), mit Hilfe von ausschliesslich Phospholipase D aus einem Phospholipid-Gemisch und ohne Verwendung organischer Lösemittel hergestellt, indem in wässriger, ungepufferter Phase mit Phospholipase D und mindestens einem zweiwertigen Metallion in einer ersten Stufe Phosphatidylsäure und in einer zweiten Stufe aus Phosphatidylsäure mit mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel (II)  $R^3 OH$  mindestens ein der allgemeinen Formel (I) entsprechendes Phospholipid hergestellt wird. Als Produkte werden insbesondere Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und/oder Phosphatidylglycerin erhalten. Als Varianten sieht die vorliegende Erfindung vor, dass P.I.D in beiden Verfahrensstufen identisch oder aber unterschiedlich ist, wobei sich im letzten Fall die pI-Werte für die erste und zweite Verfahrensstufe unterscheiden und insbesondere zwischen 6,5 und 8,0 bzw. zwischen 5,0 und 7,5 liegen. Mit diesem neuen Verfahren werden Produkte auf einfache Weise in grossen Ausbeuten und mit ausgezeichneter Reinheit erhalten, so dass sie auch für lebensmitteltechnische und/oder pharmazeutische Anwendungen geeignet sind.

WO 03/020941 A1

## Verfahren zur Herstellung von Phospholipiden

### Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Phospholipiden.

Phospholipide, auch als Lecithine bezeichnet, wie z. B. Soja- und Eigelb-Lecithin, werden seit langem in Lebensmitteln, kosmetischen Produkten, Farben, Schmiermitteln, magnetischen Materialien, Tierfutter sowie medizinischen und agrochemischen Produkten verwendet. Dabei zeigen Phosphatidylsäure-Derivate, die durch eine enzymatische Transphosphatidylierung aus Phospholipiden und Hydroxylgruppen enthaltenden Verbindungen hergestellt werden, zum Teil Eigenschaften, die denen des Ausgangsmaterials überlegen sind.

Phospholipase D (PLD) wird insbesondere zur hydrolytischen Herstellung von Phosphatidylsäure in der Gegenwart von Wasser eingesetzt und bei gleichzeitiger Anwesenheit eines zweiwertigen Metallions können Phosphatidylreste auf eine Hydroxylgruppen tragende alkoholische Verbindung als Akzeptor übertragen werden.

Damit Phospholipasen D entsprechende Transphosphatidylierungs-Aktivitäten zeigen, ist die Gegenwart zweiwertiger Metallionen unumgänglich. Lediglich bei Transphosphatidylierungs-Reaktionen zwischen identischen Phospholipid-Molekülen oder Phosphatidyl-Glycerin wurden auch entsprechende Aktivitäten in Abwesenheit zweiwertiger Metallionen nachgewiesen.

Insbesondere bei Transphosphatidylierungs-Reaktionen zwischen unterschiedlichen Phospholipid-Molekülen ist deshalb darauf zu achten,

- 2 -

dass das Reaktionssystem weder Substanzen enthält, die mit diesen zweiwertigen Ionen reagieren, noch dass Hydroxylgruppen enthaltende Verbindungen eingesetzt werden, die ihre entsprechende Reaktivität unter dem Einfluss von zweiwertigen Ionen verlieren.

Ferner ist darauf zu achten, dass beispielsweise in dem am meisten für PLD-Reaktionen eingesetzten pH-Wert-Bereich zwischen 5 und 8 keine Puffer verwendet werden, die mit zweiwertigen Ionen, und insbesondere Kalziumionen, präzipitieren.

Aus der Literatur sind zahlreiche Dokumente bekannt, die Herstellungsverfahren für Phospholipide unter Verwendung von PLD beschreiben.

Dabei stehen meist Zweiphasen-Systeme, bestehend aus einer wässrigen und einer organischen Phase, im Vordergrund, da Phospholipide als natürliche Hauptbestandteile von Biomembranen amphiphile Eigenschaften aufweisen.

Obwohl PLD auch in überstöchiometrischen Mengen an Wasser zu einer Umesterungsreaktion fähig ist, werden typischerweise organische Lösemittel oder Detergentien eingesetzt, da die verwendeten Lipidsubstrate wasserunlöslich sind und diese Lipide in Form wässriger liposomaler Dispersionen vom Enzym nur schlecht umgesetzt werden können.

Den Stand der Technik stellen somit Zweiphasen-Systeme dar, wobei das Enzym in der wässrigen Phase und das angebotene Lipid im organischen Lösemittel löslich ist; die enzymatische Reaktion vollzieht sich an der Phasengrenze zwischen Wasser und der organischen Phase.

Da die Verwendung von Detergenzien oder organischen Lösemitteln vor allem im Hinblick auf die Herstellung von pharmazeutischen Produkten oder

- 3 -

Lebensmitteln mit Problemen behaftet sein kann und unter den genannten Zweiphasen-Bedingungen das nicht immer gewünschte Hydrolyseprodukt Phosphatidylsäure entsteht, wurde nach Möglichkeiten gesucht, PLD katalysierte Umesterungsprozesse auch in rein wässriger Phase durchzuführen.

So ist aus der WO 00/77183 ein entsprechendes Verfahren zur enzymkatalysierten Umesterung oder Hydrolyse von Phospholipiden bekannt, bei denen das Enzym (u. a. Phospholipase D) in einem wässrigen Medium gelöst wird, welches eine liposomale Suspension an Phospholipiden, Wasser, einen Alkohol oder ein Alkohol-Derivat als Hydroxyl tragende Komponente und, falls erforderlich, ein zweiwertiges Metallkation enthält. Anschließend wird zum wässrigen Medium ein Silikagel gegeben und die daraus resultierende Mischung gerührt.

Die enzymatische Herstellung von Phosphatidylsäuren ist in JP 04267882 beschrieben. Dabei werden Lecithinpulver mit spezifischer Partikelgröße mit Sojabohnen-Extrakten homogenisiert, die Phospholipase C und Phospholipase D enthalten und anschließend für 24 Stunden umgesetzt. Auf diese Weise erhält man annähernd 96 % der Phospholipide als Phosphatidylsäuren.

Ein Verfahren zur Herstellung modifizierter Phospholipide ist in EP-PS 399 544 beschrieben. Demgemäß werden Phospholipide mit Phospholipase D zu Phosphatidylsäure und einer stickstoffhaltigen Base umgesetzt und mit einem weiteren Enzym (Phospholipase C, Phosphodiesterase oder einer Säurephosphatase) zu einem Diglycerid und einer Phosphorbase hydrolysiert, wobei die Umsetzung mit den beiden Enzymen bevorzugt gleichzeitig erfolgt. Beide Reaktionsschritte werden in einem 2-Phasen-System bestehend aus Puffer und organischen Lösemittel wie einem Alkylcarboxylat, einem Alkan, Kohlenwasserstoffen und anderen durchgeführt.

- 4 -

M. Kamata et al. [Yukagaku, 1993, 42 (4), 297-301] beschreiben die quantitative Umsetzung von Phosphatidylcholin-enthaltenden Sojaphospholipiden zu Phosphatidylsäure oder Phosphatidylglycerin mit Hilfe von Phospholipase D. Dabei wird die Hydrolyse des Phosphatidylcholins zur Phosphatidylsäure sowie die Transphosphatidylierung des Phosphatidylcholins zum Phosphatidylglycerin bei pH-Werten von 5,6 bzw. 4,8 durchgeführt. Zur Vermeidung der kompetitiven Hydrolyse erfolgte die pH-Einstellung mit einem Acetatpuffer.

EP-A 1 223 222 beschreibt ein Verfahren zum Austausch von Basen an einem Phospholipid als Ausgangsmaterial, bei dem das Phospholipid einer Phospholipase D in Gegenwart eines Rezeptors mit Hydroxylgruppen ausgesetzt wird. Bei dieser Reaktion, die in einem wässrigen System ausgeführt wird, ist das Phospholipid an ein Trägermaterial gebunden, die Rezeptor-Komponente und die Phospholipase D werden in freier Form eingesetzt.

Mit dem europäischen Patent 285 421 wird ein Verfahren zur Herstellung eines Phosphatidsäure-Derivats durch Einwirken von Phospholipase D auf ein Phospholipid in Anwesenheit eines Phosphatidylrest-Azeptors geschützt. Gekennzeichnet ist dieses Verfahren im Wesentlichen durch den Aktivierungsschritt der Phospholipase D durch ein organisches Lösemittel, der in Abwesenheit eines zweiwertigen Metallions durchgeführt wird und mit dem die Phospholipase D angeregt wird, die gewünschte Transphosphatidylierungsreaktion durchzuführen.

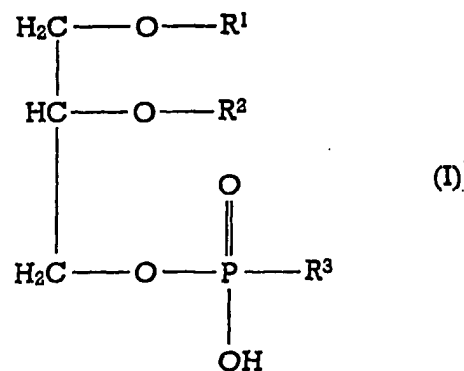
Bei den beschriebenen Verfahren des Standes der Technik ist insbesondere nachteilig, dass entweder die eingesetzten Phospholipide in liposomaler Form in Lösung gebracht werden müssen, oder aber dass sie vor deren Einsatz erst an entsprechende Trägermaterialien gebunden werden müssen, um sie der PLD zugänglich zu machen.

- 5 -

Zwar ist aus DE-OS 199 17 249 ein Verfahren zur Herstellung von Phosphatidylserin in einem rein wässrigen Einphasensystem mit Hilfe von PLD beschrieben, es werden jedoch keine genaueren Angaben zum verwendeten Lecithin, dem pH-Wert der Reaktion, zur tatsächlich angewendeten Temperatur oder aber zur Enzymquelle gemacht, weshalb eine Nacharbeitung nicht möglich ist.

Schließlich ist aus der europäischen Patentanmeldung EP 1 231 213 ein Verfahren zur Herstellung von Phosphatiden bekannt, das zwar sowohl in ausschließlich wässriger Phase und in Gegenwart von PLD durchgeführt wird, gemäß den Beispielen ist es aber zwingend erforderlich geeignete Puffer einzusetzen, um die gewünschten pH-Bedingungen gewährleisten zu können.

Für die vorliegende Erfindung hat sich somit die Aufgabe gestellt, ein Verfahren zur Herstellung von Phospholipiden der allgemeinen Formel (I)

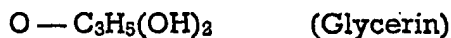
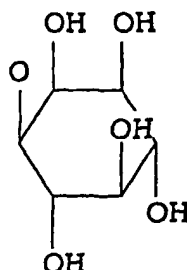
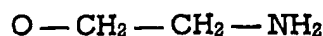
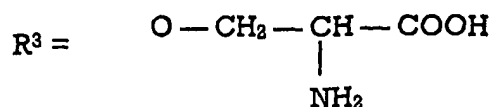


bereitzustellen, worin

$\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  unabhängig voneinander für einen gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten  $\text{C}_{10-30}$ -Acylrest stehen

und

- 6 -



bedeutet, bei dem mit Hilfe von ausschließlich Phospholipase D (PLD) aus einem Phospholipid-Gemisch die gewünschten Produkte ohne Verwendung organischer Lösemittel gewonnen werden.

Gelöst wurde diese Aufgabe mit einem entsprechenden Verfahren, bei dem in wässriger, ungepufferter Phase mit Phospholipase D (PLD) und mindestens einem zweiwertigen Metallion in einer ersten Stufe Phosphatidylsäure (PA) und in einer zweiten Stufe aus Phosphatidylsäure mit mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel (II)  $R^3 - H$ , wobei  $R^3$  die bereits für Formel (I) angegebene Bedeutung besitzt, mindestens ein Phospholipid der allgemeinen Formel (I) hergestellt wird. Als Verbindungen der Formel (II) kommen Serin, Cholin, Ethanolamin, Inosit und Glycerin (gebunden über eines der drei Sauerstoffatome) in Frage.

Überraschend hat sich in der Praxis herausgestellt, dass mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, das über die Zwischenstufe einer Phosphatidylsäure ausgeführt wird, die gewünschten Phospholipide in großer Reinheit und Ausbeute erhalten werden, ohne dass dabei die

eingesetzten Phospholipide einer komplizierten Vorbehandlung unterworfen, Trägermaterialien aus dem Reaktionsgemisch nach erfolgter Reaktion abgetrennt, oder aber Phasenübergangsbedingungen eingehalten werden müssen.

Das vorliegende Verfahren hat sich insbesondere zur Herstellung von Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinosit, Phosphatidylglycerin oder beliebigen Mischungen daraus als geeignet gezeigt, was es gegenüber den bekannten Verfahren zusätzlich vorteilhaft macht.

Auch bzgl. des Ausgangsmaterials ist das vorliegende Verfahren keinerlei Beschränkung unterworfen, weshalb als bevorzugt anzusehende Phospholipid-Gemische Lecithin und hier insbesondere Soja-, Rapsöl- und/oder Eigelb-Lecithine empfohlen werden.

Obwohl als Reaktionsmedium ausschließlich Wasser verwendet wird, kann das einzusetzende Phospholipid-Gemisch in überraschend großen Mengen verwendet werden. Diesbezüglich sieht die Erfindung vor, dass das jeweilige Phospholipid-Gemisch in Mengen von 1,0 bis 20,0 Gew.-% bezogen auf das Gesamtreaktionsgemisch eingesetzt wird, wobei sich entsprechende Dispersionen als durchaus vorteilhaft erwiesen haben.

Auch die PLD ist keinen Beschränkungen unterworfen, doch haben sich Phospholipasen D, die aus Streptomyces, Actinomadura, Erdnuss, Karotte und/oder Kohl stammen besonders bewährt.

Entgegen der weithin geltenden Auffassung, dass das pH-Optimum für Phospholipasen bei pH-Werten zwischen 6 und 7 liegen, kann das vorliegende erfindungsgemäße Verfahren bei pH-Werten des Reaktionsgemisches durchgeführt werden, die zwischen 4,0 und 9,0 liegen.

- 8 -

Auch für die Reaktionstemperatur ist ein relativ breiter Bereich möglich, wobei eine Reaktionstemperatur zwischen 10 bis 60 °C als bevorzugt anzusehen ist.

Während aus den bislang bekannten Verfahren immer wieder Schwierigkeiten mit den verwendeten zweiwertigen Metallionen bekannt wurden, kann das erfindungsgemäße Verfahren, das in einem einphasigen, wässrigen System durchgeführt wird, in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ - und/oder  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen durchgeführt werden, ohne dass dabei Ausfällungsreaktionen, eingeschränkte Enzymaktivitäten oder Wechselwirkungen mit der eingesetzten OH-Gruppen enthaltenden Verbindung auftreten.

Als bevorzugte Metallionen-Konzentration sieht die vorliegende Erfindung solche vor, die zwischen 1,0 und 100 mM liegen.

Besonders gute Umsatzergebnisse lassen sich mit PLD-Mengen erzielen, die zwischen 0,1 bis 1.000 Units/g eingesetztem Phospholipid(-Gemisch) liegen.

Dass das erfindungsgemäße Verfahren äußerst problemlos durchgeführt werden kann, zeigt neben den bereits genannten Reaktionsbedingungen auch die Tatsache, dass die in der ersten und zweiten Verfahrensstufe eingesetzte PLD identisch sein kann, weshalb die vorliegende Erfindung diese Variante als besonders bevorzugt ansieht. In diesem Fall sind PLD-Varianten besonders geeignet, die aus *Streptomyces species* und/oder *Actinomadura species* stammen.

Die vorliegende Erfindung berücksichtigt aber auch Varianten, in denen die PLD in den beiden Verfahrensstufen unterschiedlich sind.

- 9 -

In diesem Fall sieht die vorliegende Erfindung als besonders bevorzugt vor, dass in der ersten Verfahrensstufe PLD eingesetzt wird, die aus *Streptomyces chromofuscus*, Erdnuss, Karotte und/oder Kohl stammt. Dabei hat es sich als ebenfalls vorteilhaft erwiesen, wenn der pH-Wert in der ersten Stufe zwischen 6,5 und 8,0 und in der zweiten Verfahrensstufe zwischen 5,0 und 7,5 liegt.

Üblicherweise wird die eingesetzte PLD in freier Form im rein wässrigen Reaktionsmedium eingesetzt. Für bestimmte Anwendungsfälle kann es aber vorteilhaft sein, wenn die entsprechende PLD oder die eingesetzten PLD-Mischungen in immobilisierter Form verwendet werden, wobei sich dann insbesondere kovalente und/oder adsorptive Bindungsarten anbieten. Geeignete Trägermaterialien für das Enzym sind bspw. Silicagele, wie sie in Chromatographiesäulen eingesetzt werden, aber auch andere inerte Materialien mit großen Oberflächen wie Kieselgur, Aktivkohle, Bentonite und Harze oder aber dreidimensional gestaltete Adsorptionskörper.

Auch die dritte gemäß Erfindung für die Herstellungsreaktion vorgesehene Komponente, die Verbindung der allgemeinen Formel (II) ist in keiner Weise als kritisch anzusehen, doch sollte sie vorzugsweise in Konzentrationen zwischen 0,1 und 5,0 molar eingesetzt werden.

Als bevorzugte Reaktionsdauer ist erfindungsgemäß für die erste Verfahrensstufe ein Zeitraum zwischen 5 und 20 Stunden vorgesehen und für die zweite Verfahrensstufe eine Dauer von 0,5 bis 5 Stunden.

Zwar wird das angestrebte Produkt aufgrund der einfachen Verfahrensführung in einem einphasigen System in besonders guter Qualität und großer Reinheit erhalten, doch kann für spezielle Anwendungs- oder Weiterverarbeitungsfälle das erhaltene Phospholipid oder das dieses enthaltende Gemisch durch eine alkoholische Extraktion aufgereinigt werden, was von der vorliegenden Erfindung ebenfalls berücksichtigt wird.

- 10 -

Insgesamt wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine besonders umweltfreundliche und einfach durchzuführende Verfahrensvariante angeboten, aufgrund der das erhaltene Phospholipid(-Gemisch) als Endprodukt insbesondere als Lebensmittelzusatz oder bspw. auch in sogenannten Functional Food-Produkten ohne Probleme und ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt werden kann. Zudem sind keinerlei Aufreinigungsschritte im Hinblick auf die zurückbleibende Mutterlauge notwendig, so dass diese mit der sie enthaltenden PLD und ohne Regenerierungsschritte sofort wieder eingesetzt werden kann.

Die nachfolgenden Beispiele verdeutlichen die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von Phospholipiden.

#### Beispiele

In den nachfolgenden Beispielen erfolgte die Phospholipid-Herstellung erfindungsgemäß in zwei Verfahrensstufen in einem einphasigen, wässrigen System, bei dem im ersten Schritt Phosphatidylsäure durch die enzymatische Hydrolyse der Phospholipid-Komponente mit PLD und in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen hergestellt wurde. Die Reaktionstemperatur betrug 35 bis 60 °C, die Phospholipase D mikrobiellen Ursprungs wurde in Mengen eingesetzt, die 50 bis 1.500 Units/mM Phospholipid entsprachen, wobei der pH-Wert der Reaktionsmischung zwischen 5,5 und 8,0 lag.

Im zweiten Verfahrensschritt wurden die Reaktionsbedingungen gegenüber dem ersten Verfahrensschritt dahingehend geändert, dass L-Serin als OH-Gruppen tragende Komponente zugesetzt wurde und zwar in einer die eingesetzte Phospholipid-Menge übersteigenden Menge. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches lag im zweiten Verfahrensschritt zwischen 4,0 und 6,0 und die Temperatur betrug 20 bis 60 °C.

- 11 -

Als Ausgangsmaterial diente ein Phospholipid-Gemisch, enthaltend Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinosit, das in Mengen von 15 bis 175 mM verwendet wurde. Besonders geeignet hat sich als Ausgangsmaterial Epicuron® 100 P der Firma Lucas Meyer (jetzt Degussa Texturant Systems Deutschland GmbH & Co. KG), bestehend aus 20 bis 25 Gew.-% Phosphatidylcholin, 18 bis 23 Gew.-% Phosphatidylethanolamin und 12 bis 15 Gew.-% Phosphatidylinosit, sowie Epicuron® 130 (Quelle: siehe oben), mit 30 bis 35 Gew.-% Phosphatidylcholin, 15 bis 20 Gew.-% Phosphatidylethanolamin und 8 bis 13 Gew.-% Phosphatidylinosit.

Das Ausgangsmaterial wurde jeweils vor Reaktionsbeginn gut in der wässrigen Phase homogenisiert, sodann wurden  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in Konzentrationen von 100 mM eingebracht.

Die verwendete PLD wurde in immobilisierter Form gemäß Röhm (unter Verwendung von Eupergit C) eingesetzt.

#### Beispiel 1

1. Zuerst wurden eine Suspension des Phospholipid-Gemisches (2,26 mmol) und  $\text{CaCl}_2$  (10 mmol) in 100 ml Wasser mit NaOH (0,1 M) auf  $\text{pH} \approx 6,5$  bis 7,5 eingestellt. Dann wurde die Reaktion mit PLD (1.000 bis 1.500 Units) unter Rühren für 16 Stunden bei 40 °C durchgeführt. Nach 5 Stunden lag die Ausbeute an Phosphatidylsäure bei 90 % des Endwertes, was mit Hilfe der HPLC-Methode festgestellt wurde.
2. Die so erhaltene Phosphatidylsäure wurde nach der Reaktion aus der wässrigen Phase abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen, wobei Cholin, Ethanolamin bzw. Inosit und Salz-Anteile ausgewaschen wurden.

- 12 -

3. Die immobilisierte PLD verblieb im Niederschlag und wurde weiter benutzt.
4. Die gewaschene Phosphatidylsäure (1 bis 2 mmol) wurde dann weiter zu Phosphatidylserin (PS) umgewandelt. Dazu wurde die Lösung (10 mM, in Wasser) zuerst mit Salzsäure (0,1 mol/l) auf pH = 5,5 eingestellt, die Temperatur bei 30 °C gehalten und CaCl<sub>2</sub> (100 mM) sowie L-Serin in 10-fachem Überschuss der Lösung zugesetzt.
5. Unter Rühren wurde daraufhin die Reaktion 10 Stunden laufen gelassen, wobei die Ausbeute von PS nach 4 Stunden bereits bei 40 % des Endwertes lag.
6. Nach der Reaktion wurde die Lösung mit Hexan/Isopropanol extrahiert und das PS wurde durch Aceton-Fällung aufgereinigt.
7. Die immobilisierte PLD konnte aufgrund ihrer Partikel-Größe mit einem Sieb abgetrennt und wiedergewonnen werden.

#### Beispiel 2

1. Zuerst wurden eine Suspension des Phospholipidgemisches (2,26 mmol) und CaCl<sub>2</sub> (10 mmol) in 100 ml Wasser mit NaOH (0,1 M) auf pH = 7 eingestellt. Dann wurde die Reaktion mit PLD (1.000 bis 1.500 Units) unter Rühren für 16 Stunden bei 50 °C durchgeführt. Nach 5 Stunden lag die Ausbeute an Phosphatidylsäure bei 90 % des Endwertes, was mit Hilfe der HPLC-Methode festgestellt wurde.
2. Die so erhaltene Phosphatidylsäure wurde nach der Reaktion aus der wässrigen Phase abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen,

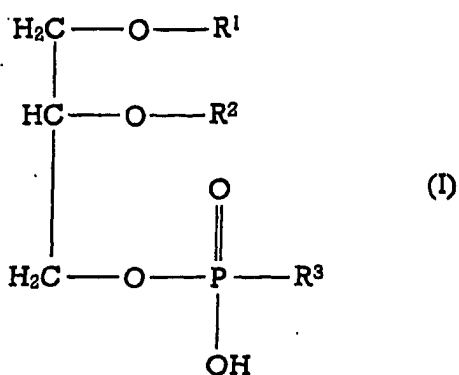
- 13 -

wobei Cholin, Ethanolamin bzw. Inosit und Salz-Anteile ausgewaschen wurden.

3. Die immobilisierte PLD konnte wegen ihrer Partikelgröße durch ein Sieb von PA-Anteilen getrennt und wiedergewonnen werden.
4. Die weiteren Schritte zur PS-Herstellung wurden gemäß Beispiel 1 (Schritte 4 bis 7) durchgeführt.

## Ansprüche

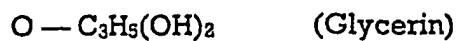
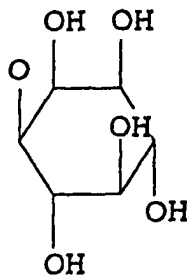
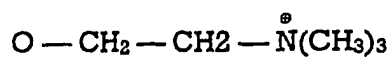
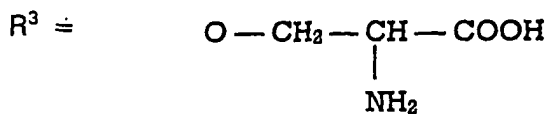
1. Verfahren zur Herstellung von Phospholipiden der allgemeinen Formel (I)



worin

$\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  unabhängig voneinander für einen gesättigten, einfach oder mehrfach ungesättigten  $\text{C}_{10-30}$ -Acylrest stehen

und



- 15 -

bedeutet,

mit Hilfe von ausschließlich Phospholipase D aus einem Phospholipid-Gemisch und ohne Verwendung organischer Lösemittel, dadurch gekennzeichnet, dass in wässriger, ungepufferter Phase mit Phospholipase D (PLD) und mindestens einem zweiwertigen Metallion in einer ersten Stufe Phosphatidylsäure (PA) und in einer zweiten Stufe aus Phosphatidylsäure mit mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel (II)  $R^3 - H$ , in der  $R^3$  die oben angegebene Bedeutung hat, mindestens ein Phospholipid der allgemeinen Formel (I) hergestellt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinosit und/oder Phosphatidylglycerin erhalten werden.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Phospholipid-Gemisch Lecithin und besonders bevorzugt Soja-, Rapsöl- und/oder Eigelb-Lecithin eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Phospholipid-Gemisch in Mengen von 1,0 bis 20,0 Gew.-% bezogen auf das Gesamtreaktionsgemisch und besonders bevorzugt als Dispersion eingesetzt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die PLD aus *Streptomyces*, *Actinomadura*, Erdnuss, Karotte und/oder Kohl stammt.

- 16 -

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert des Reaktionsgemisches zwischen 4,0 und 9,0 liegt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionstemperatur 10 bis 60 °C beträgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass als zweiwertiges Metallion  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und/oder  $\text{Zn}^{2+}$  eingesetzt werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Metallionen-Konzentration zwischen 1,0 und 100 mM beträgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die PLD in Mengen von 0,1 bis 1.000 Units/g eingesetztem Phospholipid verwendet wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die in der ersten und zweiten Verfahrensstufe eingesetzte PLD identisch ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die PLD aus *Streptomyces species* und/oder *Actinomadura species* stammt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die PLD in den beiden Verfahrensstufen unterschiedlich ist.

- 17 -

14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass in der ersten Verfahrensstufe PLD aus *Streptomyces chromofuscus*, Erdnuss, Karotte und/oder Kohl stammt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass der pH-Wert der ersten Stufe zwischen 6,5 und 8,0 und in der zweiten Stufe zwischen 5,0 und 7,5 liegt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass die PLD in immobilisierter Form eingesetzt wird, besonders bevorzugt in kovalenter und/oder adsorptiver Bindungsart.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung der allgemeinen Formel (II) in Konzentrationen zwischen 0,1 und 5,0 molar eingesetzt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Reaktionsdauer der ersten Verfahrensstufe 5 bis 20 Stunden und die der zweiten Verfahrensstufe 0,5 bis 5 Stunden beträgt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass das erhaltene Phospholipid(-Gemisch) durch eine alkoholische Extraktion aufgereinigt wird.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/09611

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P7/00 C12P9/00 C12P13/00 C07F9/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 17 249 A (MEYER LUCAS GMBH & CO) 7 September 2000 (2000-09-07) the whole document ---	1-19
P,A	EP 1 231 213 A (FIDIA FARMACEUTICI) 14 August 2002 (2002-08-14) cited in the application the whole document ---	1-19
P,A	EP 1 223 222 A (RINORU OIL MILLS CO LTD) 17 July 2002 (2002-07-17) cited in the application the whole document ---	1-19
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 December 2002

Date of mailing of the international search report

20/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Elliott, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 02/09611

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 77183 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY JERUSALEM) 21 December 2000 (2000-12-21) cited in the application the whole document ---	1-19
A	KAMATA M ET AL: "Phosphatidylglycerol preparation from soy phospholipid with phospholipase D" YUKAGAKU, JOURNAL OF THE JAPAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, vol. 42, no. 4, 1993, pages 297-301, XP009001802 ISSN: 0513-398X cited in the application abstract ---	1-19
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 055 (C-1023), 3 February 1993 (1993-02-03) & JP 04 267882 A (KAO CORP), 24 September 1992 (1992-09-24) cited in the application abstract ---	1-19
A	CA 2 055 990 A (GENZYME CORP) 23 May 1992 (1992-05-23) page 9, line 18 - line 33 ---	1-19
A	WO 91 16444 A (LIPOSOME CO INC) 31 October 1991 (1991-10-31) the whole document ---	1-19
A	EP 0 399 544 A (KAO CORP) 28 November 1990 (1990-11-28) cited in the application the whole document ---	1-19
A	EP 0 285 421 A (JAPAN RES & DEV ASS) 5 October 1988 (1988-10-05) cited in the application the whole document ---	1-19
A	RAKHIMOV M M ET AL: "PROPERTIES OF PHOSPHOLIPASE D FROM RAPHANUS SATIVUS" BIOCHEMISTRY, CONSULTANTS BUREAU, NEW YORK, NY, US, vol. 46, no. 2, PART 1, February 1981 (1981-02), pages 197-204, XP000953112 ISSN: 0006-2979 page 200 -page 202 ---	1-19
	---	
	-/--	